

· 研究论文 ·

固相萃取-高效液相色谱法同时检测土壤中 4种咪唑啉酮类除草剂残留

杨志富, 高川, 韦婧, 李雪生, 曾东强, 谭辉华*

(广西大学 农药与环境毒理研究所, 南宁 530005)

摘要:建立了一种以 SAX 固相小柱萃取和高效液相色谱(HPLC)法同时检测土壤中咪唑烟酸、甲基咪草烟、咪草酸甲酯和咪唑乙烟酸 4 种咪唑啉酮类除草剂残留的方法。考察了不同提取剂、pH、固相萃取(SPE)小柱和淋洗液体积等因素对回收率的影响。结果表明:采用 SAX 固相萃取小柱,以 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=5:3$ 混合溶液为提取剂,6 mL 甲醇为淋洗液时,在 $\text{pH}=3$ 条件下,样品的提取及净化效果较好。淋出液浓缩后用甲醇定容,过滤膜后经 HPLC 检测。添加回收试验结果表明:在 0.02~0.5 mg/kg 添加水平下,4 种除草剂的平均回收率在 86%~109% 之间,相对标准偏差(RSD) $\leq 3.3\%$ ($n=5$)。咪唑烟酸、甲基咪草烟和咪唑乙烟酸在土壤中的定量限(LOQ)均为 0.01 mg/kg,咪草酸甲酯的 LOQ 为 0.02 mg/kg。

关键词:固相萃取;高效液相色谱;咪唑啉酮类除草剂;残留;土壤

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2014.04.10

中图分类号:O657.7;TQ457 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2014)04-00433-06

Determination of four imidazolinone herbicide residues in soils by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography

YANG Zhifu, GAO Chuan, WEI Jing, LI Xuesheng,
ZENG Dongqiang, TAN Huihua*

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: A new method for determining residues of imazapyr, imazapic, imazamethabenz-methyl and imazethapyr in soil was developed by solid-phase extraction (SPE) cleanup and high performance liquid chromatography (HPLC) detection. Various extraction reagents, solvents at different pH values, various type of SPE and the elution volumes were compared. Extraction with $V(\text{acetonitrile}):V(\text{water})=5:3$ at pH 3, with SAX cartridge SPE purification of the extracts were found to be the most suitable conditions. Determination was done with HPLC coupled with diode array detector (DAD). Mean recoveries of four imidazolinone herbicides at fortification levels of 0.02-0.5 mg/kg were between 86% - 109% ($RSD \leq 3.3\%$, $n=5$). Under the optimal conditions, limits of quantification in

收稿日期:2014-03-11;修回日期:2014-04-10.

作者简介:杨志富,男,硕士研究生,E-mail:yzf19870522@yeah.net; *谭辉华,通信作者(Author for correspondence),男,副教授,博士,主要从事农药残留分析与环境毒理学研究,E-mail:jeffthh@163.com

基金项目:国家自然科学基金(31101464);公益性行业(农业)科研专项(201203098)资助;广西“特聘专家”工程专项(2013B015)经费资助.

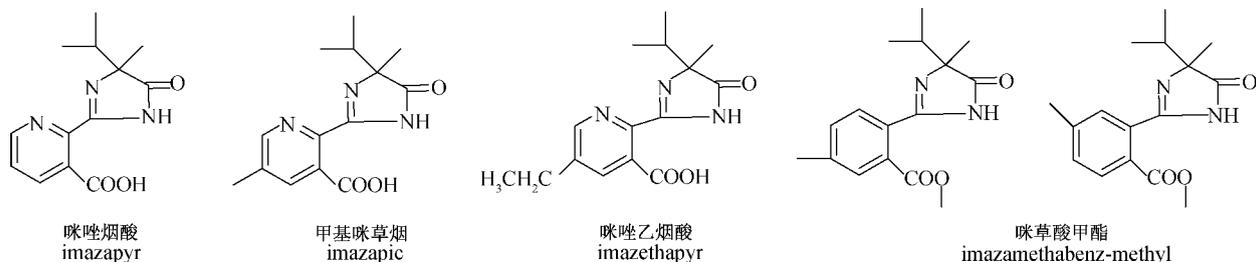
soil were 0.01 mg/kg for imazapyr, imazapic and imazethapyr, and 0.02 mg/kg for imazamethabenz-methyl ($S/N=3$).

Key words: solid-phase extraction; high performance liquid chromatography; imidazolinone herbicides; residue; soil

咪唑啉酮类除草剂是继磺酰脲类除草剂之后由美国氰胺公司研发和生产的一类高效、广谱和低毒的除草剂,在国际市场上占有绝对优势^[1]。随着咪唑啉酮类除草剂的广泛使用,其缺点也越来越突出,主要是在土壤中残留期过长,易影响后茬作物的正常生长,因此研究建立快速检测土壤中咪唑啉酮类除草剂残留的方法具有重要意义。

目前,有关咪唑啉酮类除草剂的检测方法主要有气相色谱-质谱联用法^[2]和液相色谱法^[3],费时费力,工作效率低,且有机溶剂用量大,易污染环境。

土壤基质复杂,易干扰仪器检测的灵敏度。固相萃取(SPE)技术因具有回收率稳定、净化时间短、富集倍数高以及消耗有机溶剂少等优点,可降低样品基质干扰,提高检测灵敏度,因此被广泛应用于样品前处理中^[4-8]。本研究以 SAX 固相萃取柱净化结合高效液相色谱分析,实现了同时对土壤中咪唑啉酮类除草剂(imazapyr)、甲基咪草烟(imazapic)、咪草酸甲酯(imazamethabenz-methyl)和咪唑乙烟酸(imazethapyr) 4 种咪唑啉酮类除草剂(结构式如 Scheme 1)残留的快速、简便和准确检测。



Scheme 1

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Alliance-E2695 高效液相色谱仪(带二极管阵列检测器, DAD)和 Empower 3.0 工作站(美国 Waters 公司);十二孔固相萃取装置(美国 Supelco 公司); Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国安捷伦公司); Bond Elut SAX 固相萃取小柱(500 mg/3 mL, VARIAN 公司); Milli-Q 超纯水仪[美国 Millipore(法国)公司]; MODEL868 酸度计(美国 Orion 公司)。

咪唑啉酮类除草剂(imazapyr)、甲基咪草烟(imazapic)、咪草酸甲酯(imazamethabenz-methyl)和咪唑乙烟酸(imazethapyr)标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度均为 98.0 %);乙腈和甲醇均为色谱纯,氯化钠、磷酸和无水硫酸镁均为分析纯(无水硫酸镁于 650 °C 灼烧 4 h,氯化钠于 450 °C 灼烧 4 h,冷却后于密闭干燥器中保存,备用)。

1.2 标准溶液配制

分别称取咪唑啉酮类除草剂(imazapyr)、甲基咪草烟(imazapic)、咪草酸甲酯和

咪唑乙烟酸标准品 0.025 51 g 于 4 个 25 mL 容量瓶中,用乙腈定容,配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液。再用乙腈分别稀释成各药剂质量浓度分别为 10、5、1、0.5、0.1、0.05 mg/L 的系列混合标准溶液。

1.3 色谱条件

Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温为 25 °C,流动相为 $V(0.01\% \text{ 磷酸-乙腈}) : V(0.02\% \text{ 磷酸-水}) = 30 : 70$,流速为 1.0 mL/min,紫外检测波长为 257 nm;进样量 20 μL,采用等度洗脱 15 min。在此检测条件下,咪唑啉酮类除草剂(imazapyr)、甲基咪草烟(imazapic)、咪草酸甲酯(imazamethabenz-methyl)和咪唑乙烟酸(imazethapyr)的保留时间分别为 3.7、4.9、6.6 和 7.8 min。标准品色谱图见图 1。

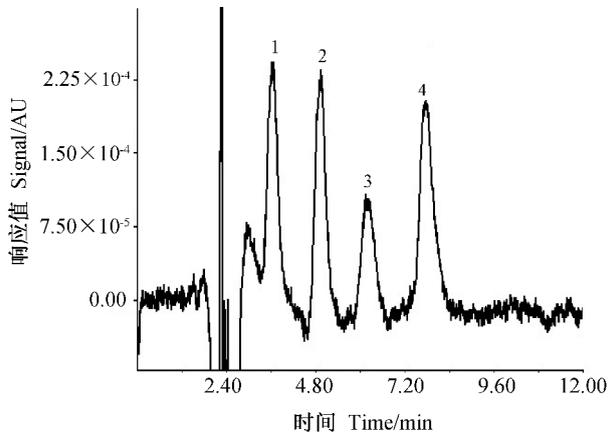
1.4 样品的采集与处理

1.4.1 供试土样的采集 土壤采集地:A)广西南宁农田(TR1);B)河南新乡农田(TR2);C)吉林长春农田(TR3)。每个采样地合理选取 5 个点,采集表层 0 ~ 10 cm 土壤,混匀,经自然风干后研磨,过 1 mm 孔径筛后测定土壤理化性质,结果见表 1。

表1 土壤理化性质

Table 1 Physical-chemical properties of soils

土壤样品编号 Sample No.	采集地 Source	土壤类型 Soil type	pH	有机质含量 Organic matter/%	阳离子交换量 Cation exchange capacity/(mol/kg)
TR1	广西南宁农田 Farmland in Nanning, Guangxi	赤红壤 Red earth	6.7	8.84	5.60
TR2	河南新乡农田 Farmland in Xinxiang, He'nan	黄土 Loess	8.3	6.78	10.23
TR3	吉林长春农田 Farmland in Changchun, Jilin	黑土 Black soil	7.1	9.53	29.81



1. 咪唑烟酸; 2. 甲基咪草烟; 3. 咪草酸甲酯; 4. 咪唑乙烟酸

1. imazapyr; 2. imazapic; 3. imazamethabenz-methyl; 4. imazethapyr

图1 4种咪唑啉酮类除草剂标准品(0.1 mg/L)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of four imidazolinone herbicides standards (0.1 mg/L)

1.4.2 样品提取 准确称取土壤样品(10.0 ± 0.1) g 加入 100 mL 离心管中,依次加入 6 mL 去离子水、10 mL 乙腈和 25 μL 磷酸,使混合体系的 pH 值为 3 左右。振荡混匀,涡旋 3 min,加入 1.0 g 氯化钠,涡旋 1 min,再加入 4.0 g 无水硫酸镁,剧烈振荡 30 s,涡旋 2 min,在 4 500 r/min 条件下离心 5 min,待净化。

1.4.3 样品净化 SPE 小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 去离子水和 2 mL 甲醇活化,移取 6 mL 上清液加入柱中,以 20 滴/min 的速度流出,收集流出液,用 6 mL 甲醇洗脱 SPE 小柱,合并流出液,浓缩至近干,用甲醇定容至 1 mL,过 0.22 μm 有机滤膜,待 HPLC 分析。

1.5 标准曲线绘制及添加回收试验

1.5.1 标准曲线的绘制 分别吸取 0.05、0.1、0.5、1.5、10 mg/L 的系列混合标准溶液于进样瓶中,按 1.3 节的色谱条件分析。以峰面积为纵坐标、

进样浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.5.2 添加回收试验 采用所建立的方法对空白样品进行添加回收试验,添加水平分别为 0.02、0.2 和 0.5 mg/kg,每个添加水平重复 5 次。

2 结果与讨论

2.1 检测条件的优化

2.1.1 检测波长选择 通过检测器全扫描发现,咪唑烟酸在 200、241 nm,甲基咪草烟在 201、257 nm,咪草酸甲酯在 201 nm,咪唑乙烟酸在 200、257 nm 处有较强吸收峰,但低波段对目标峰有干扰,故本研究选择 257 nm 作为检测波长。

2.1.2 流动相酸度确定 由于咪唑烟酸、甲基咪草烟、咪草酸甲酯和咪唑乙烟酸极性较强且呈弱酸性^[9], pKa ≤ 2,因此流动相呈酸性时可有效抑制待测组分的解离,并且可增加各组分在固定相中的保留时间,同时还可改善峰形。考察了 pH 2 ~ 7 对标准溶液分离度及响应值的影响,发现 pH > 4 或 pH < 3 时分离效果均很差,故选择 pH 3 ~ 4,此时 4 种除草剂均能很好分离且响应值符合要求。

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取剂选择 考察了乙腈、甲醇、二氯甲烷以及 V(乙腈):V(水) = 5:3 和 V(甲醇):V(水) = 5:3 的混合溶剂对质量分数为 1 mg/kg 的 4 种咪唑啉酮类除草剂的提取效果。结果发现:用单一溶剂提取时效果很差,以 V(甲醇):V(水) = 5:3 作为提取剂时,由于甲醇极性较强,提取杂质较多且不易浓缩;而乙腈极性较弱且不易提取亲脂性物质(如蜡质、脂肪和一些亲脂性色素),提取液中杂质少,故选用 V(乙腈):V(水) = 5:3 作为提取剂。

2.2.2 pH 的影响 咪唑啉酮类除草剂属弱酸性化合物,在酸性条件下以分子形态存在^[5]。故本研究

用磷酸或氢氧化钠调节提取溶液 pH 至 pKa 附近,以提高检测的灵敏度。在 1.0 mg/kg 添加水平下,考察了 pH 2 ~ 10 对回收率的影响。结果表明:pH < 4 时回收率符合要求,在 pH = 3 条件下,4 种待测物的峰面积最大,且目标峰附近无干扰,分离度高,故本研究选择 pH 值为 3。

2.3 柱净化及洗脱条件确定

2.3.1 SPE 小柱的选择 对比了 C₁₈、弗罗里硅土和 SAX 柱的净化效果。结果发现:3 种净化柱中,强阴离子交换柱 SAX 柱的净化效果最好,对羧基有较好保留,且可以去除其他杂质。

2.3.2 洗脱液体积的确定 考察了不同体积甲醇对质量浓度为 1.0 mg/L 的 4 种除草剂混合标准溶液(1 mL)的洗脱效果。结果(见图 2)发现:采用 6 mL 甲醇洗脱时,4 种除草剂的回收率已达到最高,故选用 6 mL 甲醇为洗脱液。

2.4 方法的线性范围和检测限

结果(见表 2)表明:在 0.05 ~ 10 mg/L 范围

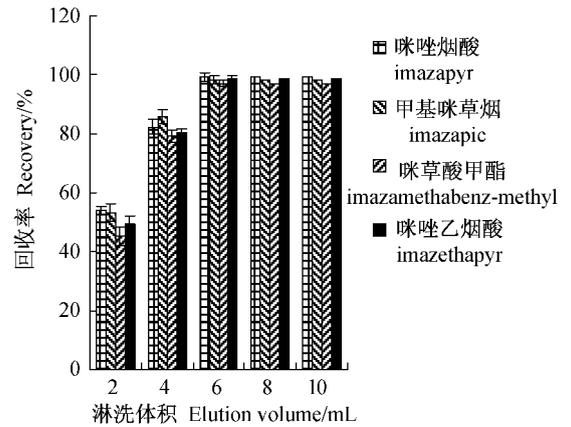


图 2 甲醇洗脱体积与回收率的关系

Fig. 2 The relationship between elution volume and recovery

内,4 种除草剂的质量浓度和峰面积之间呈良好的线性关系。咪唑烟酸、甲基咪草烟和咪唑乙烟酸在土壤中的定量限(LOQ)为 0.01 mg/kg,咪草酸甲酯的 LOQ 为 0.02 mg/kg。

表 2 待测 4 种咪唑啉酮类除草剂的标准曲线

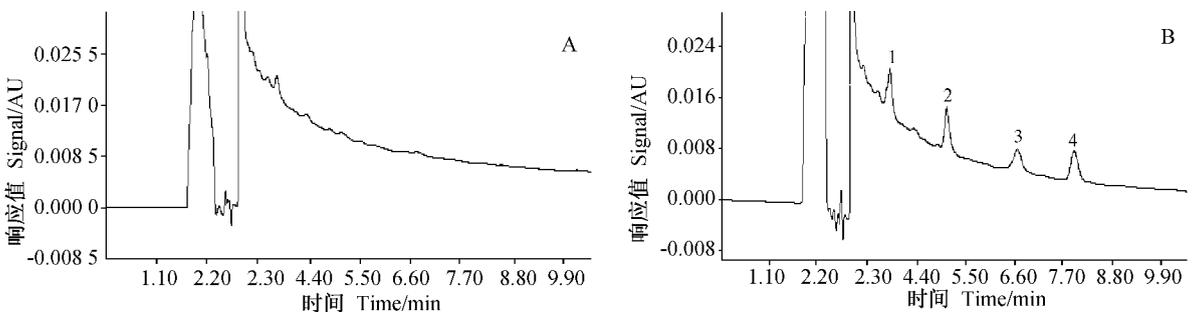
Table 2 The standard curves of the four imidazolinone herbicides

除草剂 Herbicides	线性方程 Linear equation	线性范围 Linear range (0.05 ~ 10 mg/L)	R ²
咪唑烟酸 imazapyr	$y = 35\ 784x - 701.05$		1.000 0
甲基咪草烟 imazapic	$y = 45\ 365x - 474.91$		1.000 0
咪草酸甲酯 imazamethabenz-methyl	$y = 31\ 034x - 1\ 074.6$		0.999 9
咪唑乙烟酸 imazethapyr	$y = 50\ 121x - 1\ 250.2$		1.000 0

2.5 方法的精密度和准确度

供试 4 种咪唑啉酮类除草剂在空白土壤中均未检出。添加回收结果见图 3 和表 3。从表 3 中可看

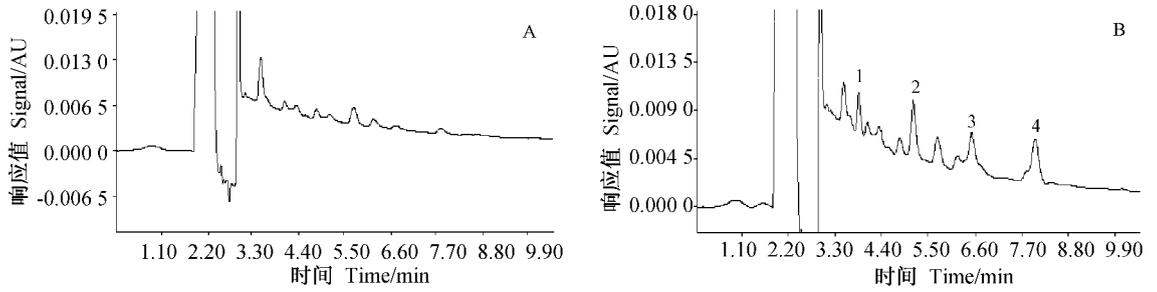
出:4 种除草剂的平均添加回收率在 86% ~ 109% 之间,相对标准偏差(RSD)为 1.2% ~ 3.3%,符合土壤中农药残留检测的要求。



1. 咪唑烟酸(imazapyr); 2. 甲基咪草烟(imazapic); 3. 咪草酸甲酯(imazamethabenz-methyl); 4. 咪唑乙烟酸(imazethapyr)

图 3 土壤空白样品(A)和添加 4 种咪唑啉酮类除草剂(0.2 mg/kg,B)回收的谱图

Fig. 3 Chromatograms of control blank soil sample(A) and blank soils spiked with four imidazolinone herbicides standards at 0.2 mg/kg(B)



A. TR3 空白土样; B. TR3 空白土样中添加 0.2 mg/kg 混合标准溶液

A. Control blank soil sample of TR3; B. Spiked herbicides (0.2 mg/kg) in soil sample of TR3

1. 咪唑烟酸(imazapyr); 2. 甲基咪草烟(imazapic); 3. 咪草酸甲酯(imazamethabenz-methyl); 4. 咪唑乙烟酸(imazethapyr)

图4 实际土壤样品色谱图(以TR3为例)

Fig. 4 Chromatograms of soil samples(TR3)

表3 待测4种咪唑啉酮类除草剂在土壤中的添加回收率和相对标准偏差($n=5$)Table 3 Recoveries and RSDs of the four imidazolinone herbicides in soil ($n=5$)

除草剂 Herbicides	添加水平 Spiked level/(mg/kg)	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%
咪唑烟酸 imazapyr	0.02	109	2.3
	0.2	92	2.6
	0.5	89	1.5
甲基咪草烟 imazapic	0.02	89	2.8
	0.2	87	1.3
	0.5	88	2.8
咪草酸甲酯 imazamethabenz-methyl	0.02	95	3.3
	0.2	103	1.5
	0.5	101	1.2
咪唑乙烟酸 imazethapyr	0.02	95	2.7
	0.2	86	1.6
	0.5	89	2.0

2.6 实际样品检测

按照本研究所建立的方法对3种类型的土壤进行了4种待测农药的检测。结果(见表4和图4)表明:在3种土壤中均未检出4种咪唑啉酮类除草剂;不同土壤的添加回收率在79%~110%之间,相对标准偏差在1.3%~6.1%之间。

3 结论

建立了一种以SAX固相小柱萃取和高效液相色谱(HPLC)法同时检测土壤中咪唑烟酸、甲基咪草烟、咪草酸甲酯和咪唑乙烟酸4种咪唑啉酮类除草剂残留的方法。该方法快速、简便、准确,在0.02~0.5 mg/kg添加水平下,4种除草剂的平均添加回收率在86%~109%之间,相对标准偏差(RSD)≤3.3%,符合农药残留检测要求。

表4 不同类型土壤样品中添加4种咪唑啉酮类除草剂的平均回收率和相对标准偏差($n=5$)Table 4 Recoveries and RSDs of the four imidazolinone herbicides in three soils ($n=5$)

除草剂 Herbicides	添加水平 Spiked level/(mg/kg)	TR1		TR2		TR3	
		平均回收率 Average recovery/%	RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%
咪唑烟酸 imazapyr	0.02	110	5.8	101	5.3	99	4.7
	0.2	85	3.7	89	3.6	85	1.5
	0.5	81	3.4	93	1.7	82	1.9
甲基咪草烟 imazapic	0.02	87	2.8	83	6.1	79	5.2
	0.2	85	3.1	87	4.3	83	3.2
	0.5	90	1.9	90	2.5	87	3.6
咪草酸甲酯 imazamethabenz-methyl	0.02	97	3.5	104	4.1	89	3.6
	0.2	106	2.0	105	2.1	83	2.9
	0.5	102	2.1	103	1.3	85	1.5
咪唑乙烟酸 imazethapyr	0.02	89	4.3	90	2.4	95	3.5
	0.2	81	2.7	93	2	92	2.4
	0.5	86	2.1	95	1.9	86	2.5

注:TR1 采自广西南宁农田;TR2 采自河南新乡农田;TR3 采自吉林长春农田。

Note: TR1. Farmland in Nanning, Guangxi; TR2. Farmland in Xinxiang, He'nan; TR3. Farmland in Changchun, Jilin.

参考文献 (Reference):

- [1] 刘长令. 咪唑啉酮类除草剂的创制经纬[J]. 农药, 2002, 41(5): 42.
LIU Changling. The route of creating imidazolinone herbicides [J]. *Agrochemicals*, 2002, 41(5): 42. (in Chinese)
- [2] STOUT S J, DACUNHA A R, ALLARDICE D G, *et al.* Microwave-assisted extraction coupled with gas chromatography/electron capture negative chemical ionization mass spectrometry for the simplified determination of imidazolinone herbicides in soil at the ppb level [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(4): 653 – 658.
- [3] CHEN Xuyan, HU Jiye. Determination of imazaquin residues in soil by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 2007, 90(2): 568 – 574.
- [4] 杨秋红, 程小艳, 杨坪, 等. 固相萃取-高效液相色谱串联质谱法同时检测地表水中的 2,4-二氯酚、2,4,6-三氯酚和五氯酚 [J]. 分析化学, 2011, 39(8): 1208 – 1212.
YANG Qihong, CHENG Xiaoyan, YANG Ping, *et al.* Simultaneous determination of 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol in surface water by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(8): 1208 – 1212. (in Chinese)
- [5] PYRZYŃSKA K, TROJANOWICZ M. Functionalized cellulose sorbents for preconcentration of trace metals in environmental analysis [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 1999, 29(4): 313 – 321.
- [6] 刘建林, 张琛, 王夏娇, 等. 基于碳纳米管的固相萃取-分散液液微萃取测定水中多种痕量环境雌激素 [J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(1): 37 – 43.
LIU Jianlin, ZHANG Chen, WANG Xiajiao, *et al.* Carbon nanotubes assisted solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for the determination of trace level environmental estrogens in aqueous solutions [J]. *Chem J Chinese Univ*, 2012, 33(1): 37 – 43. (in Chinese)
- [7] 姜俊, 李培武, 谢立华, 等. 固相萃取-全二维气相色谱/飞行时间质谱同步快速检测蔬菜中 64 种农药残留 [J]. 分析化学, 2011, 39(1): 72 – 76.
JIANG Jun, LI Peiwu, XIE Lihua, *et al.* Rapid screening and simultaneous confirmation of 64 pesticide residues in vegetable using solid phase extraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometer [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(1): 72 – 76. (in Chinese)
- [8] 叶贵标, 张微, 崔昕, 等. 高效液相色谱/质谱法测定土壤中 10 种磺酰胺类除草剂多残留 [J]. 分析化学, 2006, 34(9): 1207 – 1212.
YE Guibiao, ZHANG Wei, Cui Xin, *et al.* Determination of ten sulfonylurea herbicides in soil samples by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection [J]. *Chin J Anal Chem*, 2006, 34(9): 1207 – 1212. (in Chinese)
- [9] LIU W, PUSINO A, GESSA C. High-performance liquid chromatographic determination of the herbicide imazapyr residues in water and soil [J]. *Sci Total Environ*, 1992, 123 – 124: 39 – 43.

(责任编辑: 曲来娥)